Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk

Histochemische Untersuchungen an normalen menschlichen Thrombocyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ingrid Wieland geb. Merdas
aus Idar-Oberstein

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

Aus dem Pathologischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. P. Gedigk

Histochemische Untersuchungen an normalen menschlichen Thrombocyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Ingrid Wieland geb. Merdas
aus Idar-Oberstein

Marburg 1968

Fotodruck von Erich Mauersberger in Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg/Lahn am 22. 2. 1968

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. R. SIEGERT
Referent: Prof. Dr. med. P. GEDIGK
Correferent: Doz. Dr. med. G. KORB

Meinen Eltern

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1

II. Material und Methoden 3

III. Untersuchungsergebnisse 5

IV. Diskussion der Ergebnisse 14

V. Zusammenfassung 25

VI. Literaturverzeichnis 27

I. Einleitung

In jüngster Zeit konnten unsere Kenntnisse über die chemische Zusammensetzung und Funktion der Thrombocyten wesentlich erweitert werden. Aus neueren chemischen Analysen wissen wir, daß sie Proteine sowie neutrale, saure und basische Aminosäuren enthalten (MORITA u. ASADA 1957, MAURI, TORELLI u. GROSSI 1958, TORELLI u. MAURI 1958, Mc MENAMY u. LUND 1960, BEZKOROVAINY u. DOHERTY 1962, MAUPIN, SAINT-BLANCHARD u. STOCK 1962 sowie NOUR-ELDIN 1962). Außerdem fanden sich Lipoide, und zwar vor allem Phosphorlipoide (EGGSTEIN 1960, WOODSIDE u. KOCHOLATY 1960, BLOMSTRAND, NAKAYAMA u. NILSSON 1962, MARCUS, SAFIER u. BALLARD 1962, DEUTSCH u. STOCKINGER 1963 sowie FERGUSON, MARCUS u. ROBINSON 1963). Weiterhin konnten Poly- und Mucopolysaccharide - hauptsächlich Glycogen und saure Mucopolysaccharide - (ODELL u. ANDERSON 1957, KERBY u. LANGLEY 1959, WOODSIDE u. KOCHOLATY 1960, OLSSON, DAHLQUIST u. NORDEN 1963, WEBER, LITTMANN u. FREITAG 1963) sowie eine geringe Menge von Ribo- und Desoxyribonucleinsäure nachgewiesen werden (MASON u. RISTIC 1964). - HUMPHREY u. JAQUES (1954), HARDISTY u. STACEY (1957) sowie SCHMID, WITTE, STERN u. SCHRICKER (1959) ermittelten Serotonin (5-Hydroxytryplamin) in den Blutplättchen.

Die Funktion der Thrombocyten und die Eigenschaften der einzelnen Plättchenfaktoren wurden von LÜSCHER (1956, 1959), BETTEX-GALLAND u. LÜSCHER (1959), VOSS u. HELLEM (1959), LANDBECK u. FISCHER (1961), sowie WOODSIDE, THERRIAULT u. KOCHOLATY (1964) dargelegt.

Besondere Bedeutung für klinische und pathologisch-physiologische Probleme erlangten Untersuchungen von ODELL, TAUSCHE u. FURTH (1955), GROSS, LÖHR u. WALLER (1958 a) und STEFANINI u. KISTNER (1956), die sich mit Möglichkeiten der Thrombocytensubstitution (Isolierung und Konservierung) beschäftigten.

Über den Energiestoffwechsel der Thrombocyten unter normalen und pathologischen Bedingungen berichteten vor allem BORN u. ESNOUF (1958), GROSS, LÖHR u. WALLER (1958 b), WALLER, LÖHR, KARGES u. GROSS (1958), LÖHR, WALLER u. GROSS (1961) sowie SCHMITZ, SCHLEIPEN u. GROSS (1962). Sie stellten übereinstimmend einen hohen Gehalt der Blutplättchen an energiereichen Phosphaten (ATP und ADP) fest.

In den beiden vergangenen Jahrzehnten wurden auch die histochemischen Eigenschaften der Blutplättchen mehrfach untersucht (RHEINGOLD u. WISLOCKI 1948, WACHSTEIN 1949, TINACCI u. CESSI 1952, STORTI, PERUGINI u. SOLDATI 1953, MAUPIN 1954, PERUGINI u. SOLDATI 1954, LAWKOWICZ, CZERSKI u. POREMBINSKA 1955, GUDE, UPTON u. ODELL 1956, PERRY u. REYNOLDS 1956, ANDERSON u. ODELL 1958 sowie LAMBERS u. BAUER-SIC 1962). Als wesentliche Ergebnisse dieser histochemischen Arbeiten sind die Darstellungen von Glycogen, sauren Mucopolysacchariden und Phosphorlipoiden zu nennen. Ungeklärt blieb die Frage, ob die Thrombocyten histochemisch darstellbare Kernmaterialien enthalten, da von ROSKIN u. GRÜNBAUM (1926), CORRADETTI (1933), VOIT u. KEMPA (1934), GUTTMANN (1947) sowie MAUPIN (1954) mit Hilfe der FEULGEN-Reaktion (FEULGEN u. ROSSENBECK 1924) unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden.

In Anbetracht der Fortschritte der modernen histochemischen Methodik hielten wir es für notwendig, die histochemischen Eigenschaften isolierter Thrombocyten erneut zu erarbeiten. Dabei war es zunächst das Ziel dieser Arbeit, festzustellen, welche chemischen Bausteine der Blutplättchen sich auch mit histochemischen Methoden darstellen lassen. Gleichzeitig sollten die Ergebnisse der histochemischen Reaktionen mit den bekannten chemischen Analysedaten verglichen werden. Weiterhin war zu prüfen, ob es für die Thrombocyten charakteristische histologische Färbungen oder histochemische Reaktionen gibt, welche einzeln oder in Kombination verwandt gegebenenfalls ihre Identifizierung im Gewebe ermöglichen würden.

Die Notwendigkeit, bei der Untersuchung feingeweblicher Strukturen histochemische Methoden neben chemisch-analytischen Verfahren anzuwenden, ergibt sich auch für die vorliegende Fragestellung durch die Tatsache, daß die an isolierten Blutplättchen gewonnenen Analyse-Daten z.T. in erheblichen Grenzen schwanken und anscheinend durch Adsorptionsartefakte oder durch die Lösung von Bausteinen während der Isolierungsverfahren beeinträchtigt wurden. Im Gegensatz dazu beziehen sich die cytochemischen Methoden auf das untersuchte morphologische Substrat. Zudem sind histochemische Verfahren für die geplanten Untersuchungen von Thrombocyten bei der Blutgerinnung, und zwar in Thromben und im Gewebe, von besonderer Bedeutung, weil es nur mit diesen Methoden gelingt, einzelne und in Gruppen liegende Blutplättchen während ihres physiologischen und pathologischen Gestaltwandels im lebenden Organismus zu verfolgen.

II. Material und Methoden

A. Gewinnung der Thrombocyten

Da die Thrombocyten sehr kleine und verletzliche Gebilde darstellen und in Ausstrichen mit histochemischen Methoden nur schwache Farbkontraste zu erzielen waren, mußten sie vor Durchführung der Reaktionen angereichert werden. In der Literatur wurden dafür verschiedene Verfahren angegeben. ADELSON u. STEFANINI (1952), MINOR u. BURNETT (1952), COOMBS, MARKS u. BEDFORD (1956), sowie MATTHES u. SICKINGER (1956), FISCHER u. LANDBECK (1959) und SCHULZ u. HIEPELER (1959) schlugen zur Trennung der Thrombocyten von den übrigen geformten Blutelementen die Kombination Sedimentation und Zentrifugierung vor. FONIO (1951), STEFANINI u. DAMASHEK (1953),

SOULIER, LARRIEN u. WARTELLE (1955) sowie VULPIS (1955) verwandten dagegen die zeitsparende fraktionierte Zentrifugierung.

HJORT, RAPAPORT u. OWREN (1955), HÖRDER u. SOKAL (1955), VULPIS (1955) sowie BERGSAGEL (1956) empfahlen als Antikoagulans 3,8% Natriumcitrat; STEFANINI u. DAMASHEK (1953), LEEKSMA u. COHEN (1955) sowie ODELL, TAUSCHE u. FURTH (1955) benutzten jedoch als gerinnungshemmende Substanz Aethylendiamin-tetra-essigsäure (EDTA).

Um die aus dem Blut isolierten Plättchen von dem Antikoagulans und von adsorbierten Serumbestandteilen zu reinigen, rieten JENSEN, GRAY u. SCHAEFER (1955), BERGSAGEL (1956), SOULIER, LARRIEN u. WARTELLE (1955) sowie BASERGA u. BALLERINI (1957), sie mehrfach in physiologischer Kochsalzlösung zu waschen.

In einigen Vorversuchen konnten wir feststellen, daß 3,8% Natriumcitrat die Thrombocyten nicht unversehrt ließ und daß es z. B. mit dem Schiff'schen Reagens ~~allein~~ zu falsch positiven Resultaten kam. Nach Anwendung von EDTA wurde kein Einfluß des Antikoagulans auf den Ablauf der histochemischen Reaktion beobachtet.

Aufgrund dieser Versuche wählten wir eine Kombination der Methoden von STEFANINI u. DAMASHEK (1953) sowie LEEKSMA u. COHEN (1955) und gingen folgendermaßen vor: 80 ml frisch entnommenes Venenblut, das im Verhältnis 1:10 mit einer 1%igen EDTA-Lösung (1 g Titriplex III Merck in 100 ml 0,85% NaCl-Lösung) versetzt worden war, wurde ca. 10 min bei 1600 U/min zentrifugiert. Der abpipettierte plättchenreiche Überstand wurde bei 3000 U/min 15 min in konischen Gläsern nochmals zentrifugiert. Nach Dekantierung des Plasmas schüttelten wir das nunmehr vornehmlich aus Thrombocyten

bestehende Sediment mit einer 0,85% NaCl-Waschlösung auf und zentrifugierten es erneut. Das Waschen wiederholten wir noch zweimal. Sämtliche Glasgeräte waren silikonisiert. Mit einem silikonisierten Glasstab trugen wir die gewonnenen Blutplättchen im dicken Tropfen auf die mit Alkohol-Aether entfetteten Objektträger auf. Die Präparate wurden bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

B. Histochemische Reaktionen und histologische Färbungen

Die angewandten Verfahren sind in der Tabelle aufgeführt. Ihre theoretischen Grundlagen und die Anleitung für ihre Durchführung finden sich bei PEARSE (1960) BARKA u. ANDERSON (1963) GEDIGK u. TOTOVIĆ (1964) sowie CLARA (1965). - Fast sämtliche Reaktionen wurden an unfixierten Präparaten durchgeführt. Die Ausnahmen wurden besonders in der Tabelle vermerkt.

III. Untersuchungsergebnisse

1. Reaktionen für Proteine und Aminosäuren

Die Quecksilber-Bromphenol-Blaufärbung und die Dinitro-Fluor-Benzol-Reaktion fielen stark positiv aus; die Thrombocyten waren stark blau bzw. purpur gefärbt. Mit der Fast Green-Färbung bei pH 8 blieben die Plättchen ungefärbt.

Bei den Reaktionen für Tyrosin wiesen die Thrombocyten in der Millon'schen Reaktion einen kräftig orange-gelblichen und in der Reaktion nach Morel-Sisley einen bräunlichen Farbton auf. Vorher jodierte Präparate blieben bei anschließender Behandlung nach Morel-Sisley farblos.

Mit den DMAB-Nitrit-, Rosindol- und gekuppelten Benzyli - din-Reaktionen für Tryptophan stellten sich die Thrombocyten jeweils deutlich blau dar. Die mit Perameisen- bzw. Peressig-

säure vorbehandelten Kontroll-Präparate zeigten keine Anfärbung.

Die Sakaguchi-Reaktion für Arginin bewirkte eine deutliche orange-rote Anfärbung der Blutplättchen.

Mit der Diazonium-Reaktion nach BACHMANN für Histidin blieben die Thrombocyten ungefärbt.

In den Nachweisen für freie NH_2-Gruppen mit der Ninhydrin-Schiff- und der Hydroxy-Naphthaldehyd-Reaktion zeigten die Blutplättchen einen kräftig rosa-roten Farbton, der nach Desaminierung bzw. NH_2-Blockierung mit Dinitro-Fluor-Benzol nicht mehr sichtbar war.

Mit der zum Sulfhydrilgruppennachweis verwandten CHÈVREMONT-FRÈDÈRIC-Reaktion wurde eine sehr starke grünblaue Anfärbung der Plättchen erreicht. Auch die Dihydroxy-Dinaphthyl-Disulfid-Reaktion führte zu einer intensiv rosa Anfärbung der Thrombocyten. Die Farbintensität sank bei beiden Reaktionen ab, wenn die Blutplättchen vorher mit N-Aethyl-Maleinimid oder mit Jodacetat behandelt worden waren. Ebenso zeigte sich ein deutlicher Farbabfall nach Behandlung der Präparate mit $HgCl_2$ vor dem Reduktionstest nach CHÈVREMONT-FRÈDÈRIC.

2. Reaktionen für Lipoide

Mit Sudan III/IV behandelte Thrombocyten blieben ungefärbt; dagegen stellten sich mit Sudan Schwarz B (in 70%igen Alkohol) behandelte Präparate grau dar; in absolutem Alkohol extrahierte Thrombocyten zeigten einen geringen Farbabfall.

Bei dem sauren Haemateintest nach Baker in der Modifizierung nach SINAPIUS (1961) erschienen die Plättchen sehr stark braunschwarz. Die Farbintensität nahm nach Pyridinextraktion ab, mehr noch nach Extraktion mit absolutem Alkohol.

Mit Luxol Fast Blue färbten sich die Thrombocyten stark blau an, nach Behandlung in absolutem Alkohol zeigten sie dagegen keine Anfärbung mehr. Thrombocyten, die der Phosphormolybdänsäure-Reaktion ausgesetzt worden waren, stellten sich stark blau gefärbt dar.

Mit der Plasmal-Reaktion ließen nur die mit $HgCl_2$ behandelten Blutplättchen einen deutlichen rosa Farbton erkennen, etwas schwächer fiel die Pseudoplasmal-Reaktion aus. Mit Pyridin extrahierte Präparate blieben in beiden Reaktionen ungefärbt.

Die PAS-Reaktion führte zu einer stark rosa-roten Anfärbung der Thrombocyten, die nach Bromierung kaum noch sichtbar war. Bei der Perameisensäure-Schiff-Reaktion waren die Plättchen nur schwach angefärbt und häufig zerstört. Mit der UV-Schiff-Reaktion zeigten sie dagegen nach 2-stündiger Bestrahlung einen rosa-roten Farbton, der den zur Kontrolle bromierten Präparaten fehlte.

3. Reaktionen für Poly- und Mucopolysaccharide

In Best's Carmin gefärbte Thrombocyten zeigten einen starken roten Farbton, der nur noch schwach sichtbar war, wenn sie vorher einer Amylase- oder Speichelbehandlung ausgesetzt worden waren.

Bei der PAS-Reaktion stellten sich die Blutplättchen, wie bereits oben erwähnt, kräftig rötlich gefärbt dar. Nach der Acetylierung blieben die Thrombocyten farblos. Wurde nach der Acetylierung eine Verseifung durchgeführt, stellte sich der ursprüngliche Farbton wieder ein. An den einer Speichel- bzw. einer Amylaseverdauung ausgesetzten Thrombocyten konnte ein deutlicher Abfall der PAS-Reaktion festgestellt werden, ebenso an vorher bromierten.

Die Astrablau-, bzw. die Alcianfärbung und die Reaktion nach Hale führten zu einer starken Blaufärbung der Plättchen, die nach Hyaluronidaseeinwirkung schwächer wurde - ebenso allerdings nach Einwirkung des reinen Lösungsmittels der Hyaluronidase, nämlich einer 0,85% NaCl-Lösung. Nach vorausgegangener Methylierung färbten sich die Plättchen nicht mehr an.

Mit Toluidinblau gefärbte Thrombocyten zeigten einen deutlich rötlich-violetten - d. h. metachromatischen - Farbton, der nach vorheriger Wasserextraktion schwand. Es verblieb nur eine schwache Restbasophilie.

Die Methylenblaubindefähigkeit der Blutplättchen erlosch bei pH 3,8, und zwar auch dann, wenn die Präparate vorher mit absolutem Alkohol extrahiert worden waren. Mit Pyridin extrahierte Blutplättchen zeigten in allen pH-Bereichen eine intensivere Blaufärbung. Nach der Einwirkung von Hyaluronidase bzw. 0,85% NaCl-Lösung lag die Grenze der Methylenblaubindefähigkeit bei pH 4,1.

4. Reaktionen für Nucleinsäuren

In der Feulgen-Reaktion erschienen die einzelnen Blutplättchen sehr schwach rosa; nicht hydrolysierte Präparate blieben farblos.

Die mit Methylgrün-Pyronin (KURNICK 1952) behandelten Thrombocyten färbten sich deutlich rot an. Nach Ribonucleaseeinwirkung blieben die Plättchen ungefärbt. Mit Toluidinblau gefärbte Präparate zeigten, wie bereits oben erwähnt, eine γ-Metachromasie; die nach Wasserextraktion verbliebene Restbasophilie wurde durch enzymatische Hydrolyse mit Ribonuclease beseitigt.

Übersicht über histochemische Eigenschaften und färberisches Verhalten der Thrombocyten

1. Proteine - Aminosäuren

Quecksilber-Bromphenol-Blaufärbung (BONHAG 1955)	++
Fast Green-Färbung (ALFERT u. GSCHWIND 1953) bei pH 8	-
Dinitro-Fluor-Benzol(DNFB)-Reaktion (DANIELLI 1953, BURSTONE 1955)	+++
Millon'sche Reaktion (BENSLEY u. GERSH 1933)	++
Morel-Sisley-Reaktion (LILLIE 1957)	+
nach Jodierung (BURSTONE 1959)	-
Dimethyl-Amino-Benzaldehyd(DMAB)-Reaktion (ADAMS 1957)	+
nach Perameisensäure (1)	-
nach Peressigsäure (1)	-
Rosindol-Reaktion (GLENNER 1957)	+
nach Perameisensäure (1)	-
Gekuppelte Benzylidin-Reaktion (GLENNER u. LILLIE 1957)	+
Sakaguchi-Reaktion (modifiz. nach BAKER 1947) (2)	+
Diazonium-Reaktion nach BACHMANN (1961) (3)	-
Ninhydrin-Schiff-Reaktion (YASUMA u. ITSCHIKAWA 1953)	+
nach Blockierung mit Dinitrofluorbenzol	-
nach Desaminierung (van Slyke)	-
Hydroxy-Naphthaldehyd(HNA)-Reaktion (WEISS, TSOU u. SELIGMAN 1954)	++
nach Desaminierung	-

Reduktionstest (CHÈVREMONT u. FRÈDÈRIC 1943)	+++
nach $HgCl_2$	++
nach Phenyl-$HgCl_2$	+
nach Maleinimid	(+)
nach Jodacetat	(+)
Dihydroxy-Dinaphthyl-Disulfid(DDD)-Reaktion (BARRNETT u. SELIGMAN 1952)	+++
nach Maleinimid	+
nach Jodacetat	+

2. Lipoide

Färbung mit Sudan III/IV (KAY u. WITHEHEAD 1941)	-
Färbung mit Sudan Schwarz B (Mc MANUS 1946)	+
nach Alkoholextraktion (SINAPIUS 1961)	(+)
Saure Haematein-Methode (BAKER 1946, modif. nach SINAPIUS 1961) (4)	+++
nach Pyridinextraktion (BAKER 1946)	++
nach Alkoholextraktion	(+)
Färbung mit Luxol Fast Blue (KLÜVER u. BARRERA 1953) (5)	++
nach Alkoholextraktion	-
Phosphormolybdänsäure(PMA)-Reaktion (LANDING, UZMAN u. WHIPPLE 1952)	++
Plasmal-Reaktion (HAYES 1949) mit $HgCl_2$	+
ohne $HgCl_2$	-
mit $HgCl_2$ nach Pyridinextraktion	-
Pseudoplasmal-Reaktion mit $HgCl_2$	(+)
ohne $HgCl_2$	-

Perjodsäure-Schiff(PAS)-Reaktion (Mc MANUS 1946, GEDIGK 1952)	++
nach Bromierung	(+)
Perameisensäure-Schiff-Reaktion (GEDIGK 1952, LILLIE 1952)	(+)
UV-Schiff-Reaktion (BELT u. HAYES 1956)	+
nach Bromierung	-

3. Poly- und Mucopolysaccharide

Färbung mit Best's Carmin	++
nach Speicheleinwirkung	(+)
nach Amylaseeinwirkung	(+)
Perjodsäure-Schiff(PAS)-Reaktion (Mc MANUS 1946, GEDIGK 1952)	++
nach Acetylierung	-
nach Acetylierung und Verseifung	++
nach Speicheleinwirkung	+
nach Amylaseeinwirkung	+
Schiff-Reaktion	-
Färbung mit Astrablau (GEDIGK 1956)	++
Färbung mit Alcianblau (STEEDMAN 1950)	++
nach Hyaluronidase in 0,85% NaCl-Lösung	+
nach Extrahierung in 0,85% NaCl-Lösung	+
nach Methylierung	-
Eisenbindung (HALE 1946)	+++
nach Hyaluronidase in 0,85% NaCl-Lösung	+
nach Extraktion in 0,85% NaCl-Lösung	+
nach Methylierung	-

Färbung mit Toluidinblau [6]		+	(metachrom.)
nach Extraktion in Wasser		(+)	(orthochrom.)
Messung der Basophilie (PISCHINGER 1926, GEDIGK 1952):			
Methylenblaubindefähigkeit	bis pH 3,8	+	
nach Pyridinextraktion	bis pH 3,8	+	
nach Alkoholextraktion	bis pH 3,8	+	
nach Hyaluronidase in 0,85% NaCl-Lösung	bis pH 4,1	+	
nach Extraktion in 0,85% NaCl-Lösung	bis pH 4,1	+	

4. Nucleinsäuren

Feulgen-Reaktion für DNS (FEULGEN 1924)	(+)	
Färbung mit Methylgrün-Pyronin (KURNICK 1952)	+	(rot)
nach Ribonuclease	-	
Färbung mit Toluidinblau [6]	+	(metachrom.)
nach Extraktion mit Wasser	(+)	(orthochrom.)
nach Ribonuclease	-	

5. Histologische Darstellung

Hämatoxylin-Eosin-Färbung	++	(rosa)
van Gieson-Färbung	+	(gelb)
Azan-Färbung	+	(blau)

Reaktionsausfall: +++ = sehr stark, ++ = stark,
+ = deutlich positiv, (+) = inkonstant oder schwach,
- = negativ.

Anmerkungen:

(1) Zelloidinierte Präparate.

(2) Da das Reaktionsprodukt instabil ist und die Plättchen bei diesem Verfahren sehr leicht zerstört werden, wurde die Reaktion unter mikroskopischer Kontrolle durchgeführt, indem das Präparat mit dem Reaktionsgemisch bedeckt, ein Deckglas aufgelegt und die Farbentwicklung im Mikroskop beobachtet wurde.

(3) Präparate in neutralem Formalin fixiert und zelloidiniert.

(4) Nach SINAPIUS (1961) wurden Nativpräparate 6 Stunden chromiert und dann dem sauren Haematein ausgesetzt. In der gleichen Weise wurden mit Pyridin extrahierte (24 Std.) und mit Alkohol extrahierte (15 min in abs. Alkohol) Präparate behandelt. Unter Augenkontrolle wurde in 0,3% Boraxferricyanidlösung so lange differenziert, bis die extrahierten Kontrollpräparate braungelblich entfärbt waren. - Nur die Farbdifferenz zwischen den Kontrollpräparaten und den nicht extrahierten Präparaten wurde auf die Anwesenheit von Phosphorlipoiden bezogen.

(5) Um eine Überdifferenzierung zu vermeiden, wurden die Präparate nur 5 min mit Lithiumcarbonat nach vorgeschriebener Färbezeit differenziert (KLÜVER u. BARRERA (1953) beschränkten sich in ihren Versuchen an Nervengewebe auf wenige Sekunden).

(6) Zur Erhaltung der Metachromasie wurden die Präparate in Karion (Merck) eingeschlossen.

IV. Diskussion der Ergebnisse

A. Welche Substanzen lassen sich mit histochemischen Methoden in den Blutplättchen nachweisen?

1. Proteine und Aminosäuren

Mit chemischen Methoden waren in den Blutplättchen Proteine und Aminosäuren nachgewiesen worden: Nach HAUROWITZ und SLADEK (1928) beträgt der Eiweißgehalt 71% (Pferdethrombocyten) und nach MAUPIN (1954) sowie MAUPIN, SAINT-BLANCHARD und STOCK (1962) 57 % des Trockengewichtes der Thrombocyten. FANTL und WARD (1956) gaben an, daß 80 % des gesamten Stickstoffgehaltes der Plättchen auf die Proteine entfallen.

Mit der Immunelektrophorese wurden von SALMON (1958) aus Plättchenlysaten Fibrinogen, Albumin und eine γ-Globulinfraktion identifiziert; ein von BETTEX-GALLAND und LÜSCHER (1959) gefundenes aktinomyosinähnliches Protein soll für die Retraktion des Fibrins verantwortlich sein.

Auch BEZKOROVAINY und DOHERTY (1962) legten dar, daß Rinderthrombocyten reich an Proteinen seien; sie fanden eine ganze Reihe von Aminosäuren und als N-terminale Aminosäure Serin. Detaillierte chromatographische Aminosäurenuntersuchungen wurden von BESTETTI und CROSTI (1955), MAURI, TORELLI und GROSSI (1958), TORELLI und MAURI (1958), Mc MENAMY und LUND (1960) sowie von NOUR-ELDIN (1962) vorgenommen. Sie bestimmten in menschlichen Blutplättchen Taurin, Glutaminsäure, Serin und Glycin, Alanin in größerer Menge, ferner Arginin, Asparaginsäure, Cystein, Glutamin, Histidin, Leucin und Isoleucin, Lysin, Methionin, Ornithin, Phenylalanin, Prolin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin.-HARDISTY und STACEY (1957), SCHMID, WITTE, STERN und SCHRICKER (1959) sowie Mc MENAMY und LUND (1960) bestimmten den Serotoningehalt

der Plättchen (ca. 70 pg/10^8 Thrombocyten). BASERGA (1954) konnte elektrophoretisch eine Fraktion mit vasokonstriktorischen Eigenschaften isolieren, die mit DMAB violett erschien (s. a. w. u.) und die er mit 5-Hydroxytryptamin identifizierte.

Histochemisch wurden folgende Befunde erhoben: Die Ergebnisse der Quecksilber-Bromphenol-Blaufärbung bzw. der DNFB-Reaktion weisen in Übereinstimmung mit den obenstehenden chemischen Befunden auch histochemisch auf die Anwesenheit von Proteinen hin. Diese sind färberisch weder durch eine ausgeprägte Acidophilie gekennzeichnet - worauf die negative Fast Green-Färbung bei pH 8 hinweist - noch besonders stark basophil, da sie Methylenblau nur bis ca. pH 3,8 binden.

Mit der Millon'schen und der Morel-Sisley'schen Reaktion konnte nach entsprechender Jodierungskontrolle Tyrosin dargestellt werden.

Der positive Ausfall der DMAB-Nitrit-, der Rosindol- und der gekuppelten Benzylidin-Reaktion muß auf die Anwesenheit von Indolderivaten - besonders von Tryptophan - bezogen werden. Diese Schlußfolgerung ließ sich anhand des negativen Ausfalls der genannten Reaktionen nach Oxydation des Tryptophans durch Perameisen- bzw. Peressigsäure bestätigen. Daneben muß damit gerechnet werden, daß auch das in den Plättchen enthaltene Serotonin (= 5-Hydroxytryptamin) - wenn auch wahrscheinlich nur in geringem Umfang - am positiven Reaktionsausfall mitbeteiligt ist.

Mit der Sakaguchi-Reaktion wurde in Übereinstimmung mit PERUGINI u. SOLDATI (1954) Arginin histochemisch dargestellt.

Histidin konnte mit der Diazonium-Reaktion nach BACHMANN (1961) nicht sichtbar gemacht werden.

Die positive Ninhydrin-Schiff- bzw. Hydroxy-Naphthaldehyd-Reaktion sowie der negative Ausfall dieser Reaktionen nach einer Vorbehandlung der Präparate mit Dinitrofluorbenzol und nach einer Desaminierung zeigte, daß histochemisch darstellbare freie NH_2-Gruppen in den Thrombocyten vorliegen.

Das positive Ergebnis der DDD-Reaktion, das durch Blockierungen mit Maleinimid und Jodacetat kontrolliert wurde, ist durch eiweißgebundene Sulfhydrilgruppen und damit durch Cystein bedingt (BARKA 1963). - Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß die Fähigkeit der Thrombocyten, Fibrin zu retrahieren, von FANTL (1963) auf die Anwesenheit SH-gruppenhaltiger Substanzen bezogen wird. Nach Blockierung dieser Gruppen mit $HgCl_2$, Jodacetat und Maleinimid kam es zum Verlust dieser Funktion. -

Das Reduktionsvermögen für Ferricyanidionen bei der CHÈVREMONT-FRÈDÉRIC-Reaktion dürfte nicht nur auf der Anwesenheit von Sulfhydrilgruppen beruhen, da offenbar auch die in den Thrombocyten enthaltenen ungesättigten Lipide an dem Reaktionsausfall beteiligt sind (GEDIGK u. PIOCH 1965). Hierauf weist auch die Tatsache hin, daß nach einer Sulfhydrilgruppenblockierung noch ein abgeschwächtes Reduktionsvermögen verblieb.

Überblickt man diese Befunde, so zeigt sich, daß mit histochemischen Methoden - wie zu erwarten - nur ein relativ kleiner Teil der chemisch nachgewiesenen Substanzen dargestellt wird. Insgesamt wurden Proteine erfaßt, außerdem die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan und Arginin - nicht dagegen das sicher vorhandene, histochemisch jedoch schwer darstell-

bare Histidin. Zusätzlich waren eiweißgebundene NH_2-Gruppen darstellbar sowie SH-Gruppen, wie sie im Cystein vorkommen.

2. Lipoide

Die in der Literatur vorliegenden chemischen Analysedaten über den Lipoidgehalt der Blutplättchen schwanken zwischen 12% und 19% des Trockengewichtes (HAUROWITZ u. SLADEK 1928, CHARGAFF, BANCROFT u. STANLEY-BROWN 1936, MAUPIN 1954, WOODSIDE u. KOCHOLATY 1960), wobei über 2/3 des Fettanteils auf Phosphorlipoide entfallen; einen geringeren Prozentsatz machen Cholesterin (zwischen 1,7 % und 2,8 % des Trockengewichtes) und Neutralfette (1,3 % des Trockengewichtes) (MAUPIN 1954, MAUPIN, SAINT-BLANCHARD u. STOCK 1962) aus.

WALLACH, SURGENOR u. STEELE (1958), MARCUS u. SPAETH (1958), TROUP, REED, v. MARINETTI u. SWISHER (1960), BLOMSTRAND, NAKAYAMA u. NILSSON (1962) sowie WOODSIDE, THERRIAULT u. KOCHOLATY (1964) wiesen chromatographisch Phosphorlipoide, und zwar Kephalin, Lecithin und Sphingomyelin, in den Plättchen nach. Andere Autoren (SAKAR 1958, SLOTTA 1960 sowie FERGUSON, MARCUS u. ROBINSON 1963) fanden als gerinnungsaktiven Faktor (mit thromboplastischer Aktivität) ebenfalls Phosphorlipoide - Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin (= Kephaline).

Chromatographisch konnten WALLACH, SURGENOR u. STEELE (1958), EGGSTEIN (1960), BLOMSTRAND, NAKAYAMA u. NILSSON (1962) sowie MARCUS, SAFIER u. BALLARD (1962) in den Phosphorlipoidfraktionen außerdem Plasmalogen isolieren.

EGGSTEIN (1960) und MARCUS et al. (1961, 1962), die den Fettsäureanteil der Phosphorlipoide gaschromatographisch untersucht hatten, legten dar, daß ein Teil der Fettsäuren mehrfach ungesättigt war.

Entsprechend diesen Befunden färbten sich in den histochemischen Untersuchungen die Thrombocyten mit Sudan Schwarz B deutlich an. Die fehlende Färbung mit Sudan III/IV wies darauf hin, daß Neutralfette entweder nur in einer sehr geringen Menge oder in einer besonderen Form (Bindung an Proteine?) vorliegen, so daß sie mit dieser weniger empfindlichen Methode histochemisch nicht erfaßbar sind.

Mit der Baker'schen Reaktion ließ sich zeigen, daß in den Plättchen mit Pyridin bzw. absolutem Alkohol extrahierbare Phosphorlipoide histochemisch nachweisbar sind. Auch mit der Luxol Fast Blue-Färbung, welche phosphorlipoidhaltige Strukturen gut darstellt, waren die Plättchen blau gefärbt bzw. nach vorheriger Kontrollextraktion farblos. Dementsprechend war auch die Phosphormolybdänsäure-Reaktion stark positiv.

Acetalphosphatide konnten auch histochemisch mit der Plasmalreaktion nachgewiesen werden.

Mit der PAS-Reaktion färbten sich die Thrombocyten kräftig rosa-rot an. Nach GEDIGK (1952) sowie GEDIGK u. PIOCH (1965) können bei vorsichtiger Oxydation ungesättigter Lipide an den Doppelbindungen benachbarte Hydroxylgruppen entstehen, die sich in der Perjodsäure-Schiff-Reaktion ebenso verhalten wie die α-Glycolgruppen der Polysaccharide. Der deutliche Farbintensitätsabfall der PAS-Reaktion nach einer vorherigen Bromierung steht mit den Befunden von EGGSTEIN (1960) und MARCUS, ULLMANN u. BALLARD (1961) in Einklang, daß in den Thrombocyten Lipoide mit ungesättigten Fettsäuren vorkommen. Dementsprechend färbten sich die Thrombocyten auch bei der UV-Schiff-Reaktion gut an. Die Perameisensäure-Schiff-Reaktion erwies sich für unsere Versuche als ungeeignet, da die Plättchen z. T. zerstört wurden.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß auch histochemisch Ester- und Acetalphosphatide sowie ungesättigte Carbonsäuren in den Plättchen darstellbar sind, während zu dem Vorliegen von Neutralfetten aufgrund dieser Experimente nicht Stellung genommen werden kann.

Die Frage, ob die nachgewiesenen Lipoide in freier Form vorliegen oder ob sie an eine Proteinkomponente nach Art eines Lipoidproteinkomplexes gebunden sind, ist mit histochemischen Methoden nicht zu beantworten. Es sei aber darauf hingewiesen, daß verschiedene Autoren (BERGSAGEL u. HOUGIE 1956, PENNER, DUCKERT, JOHNSON u. SEEGERS 1956, SEEGERS 1956, SHINOWARA 1957, O'BRIEN 1958 sowie DONNER, MACH u. BRABCOVA 1958) eine in den Plättchen enthaltene Substanz mit thromboplastischer Aktivität als einen Phosphorlipoidproteinkomplex definierten.

3. Poly- und Mucopolysaccharide

a) Glykogen

Bis vor einigen Jahren war der Glykogengehalt der Thrombocyten umstritten: WAGNER (1946) fand biochemisch mit der Hagedorn-Jensen Methode in Pferdethrombocyten keinen meßbaren Glykogengehalt. 1963 bestimmten dagegen OLSSON, DAHLQUIST u. NORDEN den Glykogengehalt mit 0,092 γ/Thrombocyt. In den Experimenten von WEBER, LITTMANN u. FREITAG (1963) mit Schweinethrombocyten betrug der Glykogengehalt ca. 2,8 % des Trockengewichtes.

Auch auf Grund histochemischer Untersuchungen waren die Ansichten zunächst uneinheitlich: STAHL, HORSTMANN u. HILSNITZ (1925) glaubten, die Jodophilie der Plättchen auf Glykogen beziehen zu können; dagegen erhielten RHEINGOLD u. WISLOCKI (1948) sowie ZINGONI (1951) mit der Polysaccharidreaktion

nach Bauer im Gegensatz zu STORTI u. ZUBIANI (1949) einen negativen Reaktionsausfall, so daß sie ein Fehlen von Glykogen in den Plättchen annahmen. Aus der positiven PAS-Reaktion der unbehandelten Thrombocyten und dem negativen Reaktionsausfall nach Vorbehandlung mit Amylase schlossen jedoch WACHSTEIN (1949), WISLOCKI, RHEINGOLD u. DEMPSEY (1949), GIBB u. STOWELL (1949), STORTI, PERUGINI u. SOLDATI (1953), HITZENBERGER u. KEIBL (1954), PERUGINI u. SOLDATI (1955), GUDE, UPTON u. ODELL (1956), LAMBERS u. BAUER-SIC (1962) sowie HERTL (1964) auf die Anwesenheit von Glykogen in den Thrombocyten.

In Anbetracht unserer Versuche, d. h. des positiven Ergebnisses der Best'schen Reaktion und des Farbabfalles der PAS-Reaktion nach vorheriger Speicheleinwirkung sind wir ebenfalls der Ansicht, daß histochemisch darstellbares Glykogen in den Blutplättchen vorliegt.

b) Andere Polysaccharide oder Mucopolysaccharide

1959 wurde chromatographisch von KERBY und LANGLEY eine metachromatische Substanz mit der Wanderungsgeschwindigkeit von Chondroitin- oder Heparinsulfat ermittelt. ODELL u. ANDERSON (1957), ANDERSON u. ODELL (1958) sowie WOODSIDE u. KOCHOLATY (1960) fanden papierelektrophoretisch bzw. chromatographisch zwei Mucopolysaccharidfraktionen, von denen die erste die Wanderungsgeschwindigkeit des Chondroitinsulfates besaß und mit Alcianblau anfärbbar war, während die zweite Fraktion nicht identifiziert werden konnte und nach ANDERSON u. ODELL evtl. ein uronsäurefreies Mucopolysaccharid sein könnte. Aus diesen Ergebnissen schlossen ANDERSON u. ODELL, daß die Plättchen zwar Chondroitinsulfat, nicht aber Heparin oder Hyaluronsäure enthalten. - Von BESTETTI u. CROSTI (1955) wurden chromatographisch Glykoproteine dargestellt.

Vergleicht man die histochemischen Befunde mit diesen biochemischen Daten, so ist zunächst festzustellen, daß ein Teil des PAS-positiven Materials amylaseresistent war, daß also außer dem Glykogen noch andere PAS-positiven Substanzen in den Thrombocyten vorhanden sein müssen. Die Möglichkeiten ihrer näheren histochemischen Identifizierung wurden von GEDIGK (1952), PEARSE (1960) sowie GEDIGK u. TOTOVIĆ (1964) angegeben.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen lassen zunächst den Schluß zu, daß den perjodsäurereaktiven Substanzen neben ungesättigten Fettsäuren (s.o.) auch saure Mucopolysaccharide zugrunde liegen. Diese Annahme wurde durch die positive Hale'sche Reaktion, durch die Alcianblau- bzw. Astrablaufärbung und insbesondere durch die γ-Metachromasie bei Färbung in wässrigem Toluidinblau gestützt. Zur weiteren Klärung dieser Befunde wurde eine enzymatische Hydrolyse mit Testishyaluronidase durchgeführt, nach der wie bei GUDE, UPTON u. ODELL (1956) ein Intensitätsabfall der Hale-Reaktion beobachtet wurde. Da das gleiche Resultat jedoch auch nach Anwendung einer 0,85% NaCl-Lösung auftrat, ist anzunehmen, daß die Mucopolysaccharide wasserlöslich sind und daß es sich nur um einen unspezifischen Extraktionseffekt, nicht aber um die Folge einer enzymatischen Hydrolyse von Hyaluronsäure handelt. - Für das Vorliegen von wasserlöslichen (schwach sulfurierten?) Mucopolysacchariden in den Thrombocyten sprach die γ-Metachromasie, die nach der Färbung mit Toluidinblau auftrat und nach Extraktion der Präparate mit Wasser verschwand. Einen weiteren Hinweis gab der Grad der Methylenblaubindung der Blutplättchen. Nach GEDIGK (1952) und PEARSE (1960) sowie GEDIGK u. TOTOVIĆ (1964) färben sich mit dem basischen Farbstoff Methylenblau unter pH 4 nur noch saure Mucopolysaccharide, Nucleinsäuren und Lipoide mit ungesättigten oxydierten Fettsäuren an.

Da die Methylenblaubindefähigkeit der Thrombocyten bei pH 3,8 erlosch und dieses Ergebnis sich nach Extraktion der Fette durch absoluten Alkohol bzw. durch Pyridin nicht änderte, ist auszuschließen, daß sog. saure Lipide für die Methylenblaubindung bis zu dieser Wasserstoffionenkonzentration verantwortlich sind. Nach BRESLAU (1962) sollen jedoch RNS-haltige Strukturen noch bis pH 3,0 erfaßbar sein. Daher kann die bis pH 3,8 reichende Methylenblaubindefähigkeit der Thrombocyten sowohl durch RNS als auch durch saure Mucopolysaccharide bedingt sein.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß histochemisch neben Glykogen saure (sulfurierte?) Mucopolysaccharide in den Blutplättchen erfaßt werden. Ob außerdem ein Teil der amylaseresistenten positiven PAS-Reaktion auf Glycoproteine zurückgeführt werden muß, läßt sich anhand der uns zur Verfügung stehenden histochemischen Methoden nicht entscheiden.

4. Nucleinsäuren

a) Desoxyribonucleinsäure (DNS)

1936 schlossen ROHR u. KOLLER aus der chemischen Bestimmung des Purinstickstoffs auf die Anwesenheit von Kernbestandteilen in den Thrombocyten; FANTL u. WARD fanden 1956, daß der Nucleinsäurestickstoff der Plättchen nur 0,11% des gesamten Stickstoffs ausmacht. MASON u. RISTIC (1964) bezeichneten den DNS-Gehalt von Kälberthrombocyten mit $0{,}64 \times 10^{-9}$ µg/Blutplättchen.

Zum histochemischen Nachweis der Desoxyribonucleinsäure (DNS) verwandten die meisten Autoren (ROSKIN u. GRÜNBAUM 1926, CORRADETTI 1933, STORTI u. STORTI 1935, RHEINGOLD u. WISLOCKI 1948, CAJANO u. POLOSA 1950, HITZENBERGER u.

KEIBL 1954, MAUPIN 1954, MAUPIN u. Mitarb. 1954, 1962, LAWKOWICZ, CZERSKI u. POREMBINSKA 1955 sowie GUDE, UPTON u. ODELL 1956) die Feulgen-Reaktion, die stets negativ ausfiel. Nur VOIT u. KEMPA (1934) berichteten über eine schwache Reaktion im dicken Ausstrich und bezogen sie auf die Anwesenheit von Thymonucleinsäure. GUTTMANN (1947) fand allerdings kein für Thymonucleinsäure spezifisches Absorptionsmaximum im UV-Licht. MIZUMO, SAUTTER u. SCHULTZE (1958), die in Kälberthrombocyten auf Grund der UV-Absorption nur Spuren von Pentose bzw. Desoxypentosenucleinsäure annahmen, konnten DNS mit der Feulgen-Reaktion nicht nachweisen.

Die sehr schwache Anfärbung der Präparate in den Versuchen bei der Feulgen-Reaktion darf unseres Erachtens nicht auf den von MASON u. RISTIC (1964) ermittelten geringen Gehalt an DNS bezogen werden. Wahrscheinlicher ist es, daß es sich hier um eine sogenannte Pseudo-Plasmal-Reaktion handelt, da Aldehydgruppen der Acetalphosphatide ebenfalls durch saure Hydrolyse freigesetzt werden können. Jedenfalls ist die biochemisch nachgewiesene Menge DNS in den Blutplättchen so gering, daß nicht damit gerechnet werden kann, daß sie mit der Feulgen-Reaktion dargestellt wird.

b) Ribonucleinsäure (RNS)

In der Literatur wurde mitunter die Anwesenheit von Ribonucleinsäure (RNS) in den Thrombocyten - zumindest in Spuren - angenommen. 1946 schloß WAGNER aus seinen chemischen Untersuchungsergebnissen (Bestimmung des gesamten Nucleinsäurephosphors bzw. des Pentosenucleinphosphors in Pferdethrombocyten), daß die Nucleinsäuren der Blutplättchen aus RNS bestehen. GREENE (1954) fand ein Ribonucleoprotein, das bei saurem pH leicht denaturiert wurde und aus dem sich RNS abspaltete.

Die Ergebnisse unserer histochemischen Versuche stehen in Übereinstimmung mit denen von MAUPIN (1954), GUDE, UPTON u. ODELL (1956) sowie PERRY u. REYNOLDS (1956). Die Methylgrün-Pyronin-Methode ergab einen für RNS charakteristischen Ausfall der Farbreaktion. Im Gegensatz zu MAUPIN's Beobachtung verschwand in unseren Präparaten nach einer Behandlung mit Ribonuclease sowohl die Pyroninophilie der Thrombocyten als auch die nach Wasserextraktion verbleibende geringe Basophilie bei der Toluidinblaufärbung. Diese Befunde möchten wir auf die Anwesenheit von RNS in den Thrombocyten beziehen.

B. Welche histochemischen Methoden sind zur Charakterisierung der Thrombocyten geeignet?

Überblickt man die vorliegenden Befunde, so zeigt es sich, daß eine Reihe von histochemischen Reaktionen und Färbungen an den Thrombocyten stark positiv ausfallen, und zwar die Quecksilber-Brom-Phenol-Blau-Färbung, die Dinitro-Fluor-Benzol-Reaktion, die Millon'sche Reaktion, die Hydroxy-Naphthaldehyd-Reaktion, der Reduktionstest nach CHÈVREMONT-FRÉDÉRIC, die Dihydroxy-Dinaphthyl-Disulfid-Reaktion, die saure Haematein-Methode nach BAKER, die Färbung mit Luxol-Fast-Blue, die Phosphormolybdänsäure-Reaktion, die PAS-Reaktion, die Färbung mit Best'schem Carmin und die Färbungen mit Astrablau und Alcianblau sowie die Eisenbindungs-Reaktion. Diese Reaktionen sind an sehr verschiedene Bausteine bzw. reaktionsfähige Gruppen in den Thrombocyten gebunden, wobei die Eiweißbausteine sowie Lipoide und Polysaccharide im Vordergrund stehen. Es liegt auf der Hand, daß keine der genannten Reaktionen oder Färbungen für Thrombocyten charakteristisch ist, weil diese Bausteine auch in vielen anderen Gewebsbestandteilen und Strukturen in wechselnder Menge vorkommen. [Selbst bei der Verwendung mehrerer Reaktionen ergibt sich keine für Thrombocyten kennzeichnende Kombination von

positiven Reaktionen. Die Darstellung von Thrombocyten oder Thrombocytenansammlungen im Gewebe wird sich daher auch weiterhin auf morphologische Kriterien stützen müssen.

Die genannten histochemischen Verfahren sind aber wegen ihres starken und z. T. sehr ausgeprägten positiven Reaktionsausfalles durchaus geeignet, um Um- sowie Abbauvorgänge an den Blutplättchen bei der Blutgerinnung in Gefäßen oder im Gewebe zu verfolgen. In weiteren Experimenten wird zu prüfen sein, welche Rückschlüsse sich dadurch auf das Verhalten der Thrombocyten bei der Bildung sowie bei dem Abbau von Thromben oder bei der Blutstillung im Gewebe ergeben.

V. Zusammenfassung

Durch die Anwendung moderner histochemischer Verfahren wurde ermittelt, welche Substanzen sich mit histo- und cytochemischen Methoden in Thrombocyten darstellen lassen. Dabei zeigte es sich, daß neben Proteinen die Aminosäuren Tyrosin, Tryptophan (bzw. Tryptamin) und Arginin sowie α-terminale NH_2-Gruppen und Sulfhydril-Gruppen darstellbar sind. Weiterhin fanden sich extrahierbare Ester- und Acetal-Phosphatide und ungesättigte Carbonsäuren. Auch konnten Glykogen und saure Mucopolysaccharide sowie in geringem Umfang Ribonucleinsäuren histochemisch nachgewiesen werden.

Keines der genannten histochemischen Verfahren und keine Kombination verschiedener Methoden erwies sich für Thrombocyten so charakteristisch, daß ihre Identifizierung im Gewebsverband aufgrund histochemischer oder färberischer Verfahren möglich wäre.

Einige stark und ausgeprägt positiv ausfallende Reaktionen dürften aber geeignet sein, die Umbau- und Abbauvorgänge der Blutplättchen innerhalb der Gefäße oder im Gewebsverband zu verfolgen.

VI. L I T E R A T U R

ADAMS, C.W.M.: A p-dimethylaminobenzyldehydenitrit method for the histochemical demonstration of tryptophan and related compounds.
J. clin. path., London 10, 56 - 62 (1957)

ADELSON, E. and M. STEFANINI: Studies on platelets. VI. Demonstration and characterization of a heterologous (Forssmann) platelet agglutinin.
Blood 7, 700 - 709 (1952)

ANDERSON, B. and T. ODELL: Chemical studies of mucopolysaccharides of rat blood platelets.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y. 99, 765 - 768 (1958)

BACHMANN, R. u. H.M. SEITZ: Zur histochemischen Darstellung des Histidin mit Diazoniumsalzen.
Zschr. Zellforsch. 2, 307 - 312 (1961)

BAKER, J.R.: The histochemical recognition of certain guanidinderivates.
Quart. J. Microsc. Sc. 88, 115 - 121 (1947)

BARKA , I. and P.J. ANDERSON: Histochemistry, Theory, Practice and Bibliography.
Harper u. Row., New York, Evanstone and London 1963

BASERGA, A.: Les facteurs plaquettaires.
Sang, Paris 25, 742 - 751 (1954)

-- et G. BALLERINI: La résistence osmotique des plaquettes.
Schweiz. med. Wschr. 187, 1218 - 1220 (1957)

BELT, W.D. and E.R. HAYES: An ultraviolet-Schiff reaction for unsaturated lipids.
Stain Technol., Geneva, N.Y. 31, 117 - 122 (1956)

BERGSAGEL, D.E.: Viscous metamorphosis of blood platelets: Morphological platelet changes include by an intermediate product of blood thromboplastin formation.
Brit. J. Haematol. 2, 130 - 138 (1956)

-- and C. HOUGLE: Intermediate stages in the formation of blood thromboplastin.
Brit. J. Haematol. 2, 113 - 129 (1956)

BESTETTI, A. e P.F. CROSTI: Indagini chimiche sulle piastrine I: Aminoacidi e glucidi constitutivi piastrinice. Atti Soc. lombard. Sc. med. 10, 278 - 281 (1955)

BETTEX-GALLAND, M. and E.F. LÜSCHER: Extraction of an actino-myosin-like protein from human thrombocytes. Nature 184, 276 - 277 (1959)

BEZKOROVAINY, A. and D. DOHERTY: Properties of structural proteins of bovine platelets. Arch. Biochem. Biophys. 86, 412 - 418 (1962)

BLOMSTRAND, R., F. NAKAYAMA and I.M. NILSSON: Identification of phospholipids in human thrombocytes and erythrocytes. J. Laborat. Clin. Med. 59, 771 - 778 (1962)

BORN, G.U.P. u. M.P. ESNOUF: Biochemical changes in platelet-rich Plasma during clotting. Proc. IV. Int. Congr. Biochem. Vienna 1958, Bd. 10, 97 - 104

BRESLAU, A.M.: Polysaccharides in microorganisms. In: Handbuch der Histochemie Bd. II/1, S. 8 - 13 Stuttgart: Gustav Fischer 1962

BURSTONE, M.S.: Histochemical methods for protein detection. In: Handbuch der Histochemie Bd. III/2, S. 244 - 284 Stuttgart: Gustav Fischer 1959

CAJANO, A. e P. POLOSA: Contributo allo studio della morfologia dei megacariociti e delle piastrine con la reazione di Feulgen. Haematologica, Pavia 34, 1113 - 1121 (1950)

CHARGAFF, E., F.W. BANCROFT and M. STANLEY-BROWN: Studies on the chemistry of blood coagulation: III. The chemical constituents of blood platelets and their role in blood clotting with remarks on the activation of clotting by lipids. J. Biol. Chem., Baltimore 116, 237 - 251 (1936)

CLARA, M.: Methoden der Histochemie. In: Handbuch der Histochemie Bd. V Stuttgart: Gustav Fischer 1965

COOMBS, R.A., J. MARKS and D. BEDFORD: Specific mixed agglutination: Mixed erythrocyte-platelet anti-globulin reaction for the detection of platelet antibodies. Brit. J. Haematol. 2, 84 - 94 (1956)

CORRADETTI, A.: La reazione nucleare di Feulgen sulle piastine.
Boll. Soc. ital. biol. sper. 8, 603 - 605 (1933)

DEUTSCH, E. u. L. STOCKINGER: Strukturproblem der Thrombocyten.
Wien. Zschr. inn. Med. 44, 61 - 84 (1963)

DONNER, L., O. MACH u. S. BRABCOVA: Elektrophorese der Blutplättchen.
Acta Haemat., Basel 20, 369 - 375 (1958)

EGGSTEIN, M.: Untersuchungen über den Thrombocytenfaktor 3.
Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 66. Kongr. Wiesbaden 1960, S. 981 - 985

FANTL, P.: Thiolgroups of blood platelets in relation to clot retraction.
Nature 198, 95/- (1963)

-- and H.A. WARD: Nucleotides of human blood platelets.
Biochem. J., London 64, 747 - 754 (1956)

FERGUSON, J.H., A.J. MARCUS and A.J. ROBINSON: Purified platelet phospholipids and blood coagulation.
Blood 22, 19 - 35 (1963)

FEULGEN, F. u. H. ROSSENBECK: Mikroskopisch-chemischer Nachweis einer Nucleinsäure.
Zschr. Physiol. Chem., Leipzig 135, 203 - 248 (1924)

FISCHER, K. u. G. LANDBECK: Ein Beitrag zur Thrombocytenisolierung für gerinnungsanalytische und immunhaematologische Untersuchungen.
Klin. Wschr. 37, 562 - 563 (1959)

FONIO, A.: Über das funktionelle Verhalten der isolierten Strukturelemente der Thrombocyten, des Hyalomers und des Granulomers.
Acta haemat., Basel 6, 207 - 212 (1951)

GEDIGK, P.: Histochemische Darstellung von Kohlenhydraten.
Klin. Wschr. 30, 1057 - 1065 (1952)

-- Über neue Färbeverfahren für Mucopolysaccharide und Phosphorlipoide.
Zbl. Pathol. 95, 486/- (1956)

-- u. V. TOTOVIĆ: Histochemische Methoden.
In: Biochemisches Taschenbuch, 2. Teil, Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1964

GEDIGK, P. u. W. PIOCH: Über die formale Genese lipogener Pigmente. Untersuchungen mit Estern hochungesättigter Fettsäuren.
Virch. Arch. 339, 100 - 135 (1965)

GIBB, R.P. and R.E. STOWELL: Glycogen in human blood cells.
Blood 4, 569 - 579 (1949)

GLENNER, G.G. and R.D. LILLIE: The histochemical demonstration of indole derivates by the post-coupled p-dimethylaminobenzylidine reaction.
J. Histochem. Cytochem. 5, 279 - 296 (1957)

GREENE, R.W.: Effect of pH on platelets and identication of ribonucleoprotein from platelets.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y. 87, 412 - 414 (1954)

GROSS, R., G.W. LÖHR und H.D. WALLER (a): Physiologische und klinische Probleme der Thrombocytensubstitution.
Proc. 7. Congr. Int. Soc. Blood Transfusion S. 917 - 924 (1958)

GROSS, R., G.W. LÖHR und H.D. WALLER (b): Zur Biochemie der Thrombocyten.
Proc. IV. Int. Congr. Biochem., Wien 1958, Bd. 10, S. 92 - 96

GUDE, W.D., A.C. UPTON and T.T. ODELL jr.: Blood platelets of human and rat.
Laborat. Invest. 5, 348 - 358 (1956)

GUTTMANN, W.: Die Kernsubstanzen der Blutplättchen.
Zschr. inn. Med. Leipzig 2, 362 - 376 (1947)

HALE, C.W.: Histochemical demonstration of acid polysaccharides in animal tissues.
Nature 157, 802/- (1946)

HARDISTY, R.M. and R.S. STACEY: Platelet 5-hydroxytryptamine (HT) in disorders of the blood.
Brit. J. Haematol. 3, 291 - 298 (1957)

HAUROWITZ, F. u. J. SLADEK: Über die chemische Zusammensetzung der Blutplättchen.
Zschr. Physiol. Chem., Leipzig 173, 233 - 234 (1928)

HERTL, M.: Zytochemische Untersuchung von Zytoplasmafragmenten und Gumprecht'schen Schollen bei akuten Leucosen.
Acta haemat., Basel 31, 249 - 302 (1964)

HITZENBERGER, G. u. E. KEIBL: Cytochemische Untersuchung zur Frage der Thrombocytenabstammung.
Wien. Klin. Wschr. 66, 669 - 673 (1954)

HJORT, P., S.J. RAPAPORT and P.A. OWREN: Evidence that platelet accelerator (pl.fact. 1) is adsorbed plasma proaccellerin.
Blood 10, 1139 - 1150 (1955)

HÖRDER, M.H. u. G. SOKAL: Der Einfluß von Faktor V auf die Plasmathromboplastinbildung.
Acta haemat., Basel 14, 294 - 302 (1955)

HUMPHREY, J.H. and R. JAQUES: The Histamine and Serotonine content of the platelets and polymorphnuclear leucocytes of various species.
J. Physiol. (Lond.) 124, 305 - 310 (1954)

JENSEN, H., E.J. GRAY and E.H. SCHAEFER jr.: Formation of blood thrombokinase.
Acta haemat., Basel 13, 377 - 386 (1955)

KERBY, G.P. and N. LANGLEY: Human thrombocytes and leukocytes as a source of some of the acid mucopoly-saccharides of serum.
J. Lab. Clin. Med. 53, 708 - 713 (1959)

KLÜVER, H. and E. BARRERA: A method for the combined staining of cells and fibers in the nervous system.
J. Neuropath. Exper. Neurol. 12, 400 - 403 (1953)

KURNICK, N.B.: Histological staining with methyl-green pyronin.
Stain. Technol. 27, 233 - 242 (1952)

LAMBERS, K. u. P. BAUER-SIC: Zur Cytochemie der Blutzellen.
Dtsch. med. Wschr. 87, 1913 - 1917 (1962)

LANDBECK, G. u. K. FISCHER: Experimentelle Studien über die Beeinflußbarkeit der Faktor-3-Aktivität normaler Humanthrombocyten durch Antikörper.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 66, 985 - 988 (1961)

LAWKOWICZ, W., P. CZERSKI and H. POREMBINSKA: Cytochemical studies on blood platelets and megacaryocytes in normal subjects and in cases of thrombocytopenic purpura of various origin.
Rev. belge path. 24, 524 - 533 (1955)

LEEKSMA, C.H.W. and J.A. COHEN: Determination of the life of human blood platelets using labelled diisopropylfluorophosphonate.
Nature 175, 552 - 553 (1955)

LÖHR, G.W., H.D. WALLER u. R. GROSS: Beziehungen zwischen Plättchenstoffwechsel und Retraktion des Blutgerinnsels (unter besonderer Berücksichtigung der Thrombopathien Glanzmann-Naegeli).
Dtsch. Med. Wschr. 86, 897 - 904 (1961)

LÜSCHER, E.F.: Die physiologische Bedeutung der Thrombocyten.
Schweiz. med. Wschr. 86, 345 - 351 (1956)

-- Die Biochemie der Gerinnungsfaktoren.
Proc. IV. Int. Congr. Biochem. Wien 1958,
Bd. 10, 75 - 91

-- Thrombocytenfaktoren.
Erg. Physiol. 50, 1 - 74 (1959)

MARCUS, A.J. and T. SPAETH: Platelet phosphatides: their separation, identification and clotting activity.
J.Clin. Invest. 37, 1836 - 1847 (1958)

-- , H.L. ULLMAN and H.S. BALLARD: Fatty acids of human platelet phosphatides.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 107, 483 - 486 (1961)

-- , -- , L.B. SAFIER and H.S. BALLARD: Platelet phosphatides, their fatty acid and aldehyde composition and activity in different clotting systems.
J. Clin. Invest. 41, 2198 - 2212 (1962)

MASON, R.A. and M. RISTIC: Determination of nucleic acids in bovine blood platelets.
Amer. J. Vet. Res. 25, 122 - 127 (1964)

MATTHES, M. u. K. SICKINGER: Herstellung von Thrombocytenkonzentraten für Transfusionszwecke bei Verwendung verschiedener Dextranfraktionen.
Acta haemat., Basel 15, 278 - 295 (1956)

MAUPIN, B.: Les plaquettes sanguines de l'homme.
Recherches histochimiques et biochimiques sur les plaquettes sanguines de l'homme.
Paris: Masson u. Cie 1954

-- , J. SCHNEBELLI et R. ARDRY: Recherche des acides nucleiques dans les plaquettes sanguines de l'homme.
Soc. Biol. 148, 441 - 443 (1954)

-- , J. SAINT-BLANCHARD et J. STOCK: Soufre, Taurine, Proteines et ATP plaquettaires.
Rev. frc. étud. clin. biol. 7, 169 - 173 (1962)

MAURI, C., U. TORELLI e G. GROSSI: Ricerche cromatografiche sugli amino acidi liberi nelle piastrine dell'uomo normale.
Boll. Soc. ital. biol. sper. 34, 152 - 154 (1958)

Mc MENAMY, H.R. and D.C. LUND: Concentration of unbound amino acids in human platelets.
Biochim. biophysica Acta, N.Y. 45, 603 - 605 (1960)

MINOR, A.H. and L. BURNETT: A method for separating and concentration platelets from normal human blood.
Blood 7, 693 - 699 (1952)

MIZUMO, N.S., J.H. SAUTTER and M.O. SCHULTZE: Enzyme and nucleic acid content of thrombocytes from normal and thrombocytopenic calves.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y. 98, 42 - 46 (1958)

MORITA, H. et T. ASADA: Etude morphologique des plaquettes sanguines de l'homme.
Sang, Paris 28, 827 - 855 (1957)

NOUR-ELDIN, F.: Free amino compounds in blood platelets.
Nature 196, 1219/- (1962)

O'BRIEN, J.R.: Phospholipids, proteins and platelet lipoid.
Nature 181, 420/- (1958)

ODELL, T.T. jr. and B. ANDERSON: (a) Chemical nature of mucopolysaccharides extracted from blood platelets.
Fed. Proc. 17, 119/- (1957)

-- (b) Isolation of a sulfated mucopolysaccharide from blood platelets of rats.
Proc. Soc. Exper. Biol. Med., N.Y. 94, 151 - 156 (1957)

-- , F.G. TAUSCHE u. J. FURTH: Platelet life span as measured by transfusion of isotopically labelled platelets into rats.
Acta haemat., Basel 13, 45 - 52 (1955)

OLSSON, I., A. DAHLQUIST and A. NORDEN: Glycogen content of leucocytes and platelets.
Acta med. Scand. 174 123 - 127 (1963)

PEARSE, A.G.: Copperphthalocyanins as phospholipid stains. J. Path. Bact. 70, 554 - 557 (1955)

-- Histochemistry. Theoretical and applied. 2. ed. London: Churchill 1960

PENNER, J.A., F. DUCKERT, S.A. JOHNSON and W.H. SEEGERS: Conversion of prothrombin to autoprothrombin II. Canad. J. Biochem. 34, 1199 - 1209 (1956)

PERRY, S. and J. REYNOLDS: Methylgreen pyronin as a differential nucleic acid stain for peripheral blood smears. Blood 11, 1132 - 1139 (1956)

PERUGINI, S. and M. SOLDATI: Ricerche citochimiche sulla componente proteica delle cellule ematiche. I. L'arginina nelle cellule del sangue umano normale. Riv. istochim. norm. Pat. 1, 217 - 226 (1954)

-- , -- Cytochemical studies of the megacaryocytes and platelets in pathological conditions. Schweiz. med. Wschr. 86, 1437 - 1439 (1955)

RHEINGOLD, J.J. and G.B. WISLOCKI: Histochemical methods applied to hematology. Blood 3, 641 - 655 (1948)

ROHR, K. u. F. KOLLER: Über die Abstammung der Thrombocyten. Klin. Wschr. 15, 1549 - 1553 (1936)

ROMEIS, B.: Mikroskopische Technik. Leibnitz, München, 1948

ROSKIN, G.O. u. F.T. GRÜNBAUM: Beiträge zur Kenntnis der Blutplättchen. Virch. Arch. path. Anat. 261, 528 - 532 (1926)

SALMON, J.: Etude immunoélectrophorétique des antigènes plaquettaires humaines. Schweiz. med. Wschr. 88, 1047 - 1049 (1958)

SAKAR, N.K.: Phospholipids in blood clotting. Proc. IV. Int. Congr. Biochem. Wien 1958, Bd. 10, 119 - 122

SCHMID, E., S. WITTE, J. STERN u. K.T. SCHRICKER: Untersuchungen über den Serotoningehalt des Blutes bei haematologischen Erkrankungen. Verh. Dtsch. Ges. inn. Med. 65, 181 - 183 (1959)

SCHMITZ, H., Th. SCHLEIPEN u. R. GROSS: Freie Nucleotide in normalen menschlichen Thrombocyten.
Klin. Wschr. 40, 13 - 15 (1962)

SCHULZ, H. u. E. HIEPELER: Über die Lokalisierung von gerinnungsphysiologischen Aktivitäten in submikroskopischen Strukturen der Thrombocyten.
Klin. Wschr. 37, 273 - 285 (1959)

SEEGERS, H.W.: Recent advances in our knowledge of platelet factor 3.
Proc. VI. Int. Congr. Int. Soc. Haemat.
Boston 1956, 469 - 477

SHINOWARA, C.Y.: Thromboplastic cellcomponent, the lipoprotein of erythrocytes and platelets.
J. Biol. Chem., Baltimore 225, 63 - 75 (1957)

SINAPIUS, D.: Über Chromierungsmethoden zur Lipiddarstellung.
Histochemie 2, 217 - 233 (1961)

SLOTTA, H.N.: Phospholipids in blood coagulation:
Fed. Proc. 19, 59/- (1960)

SOULIER, J.P., M.J. LARRIEN and O. WARTELLE: La thromboplastinoformation dans les affections plaquettaires.
Acta haemat., Basel 14, 160 - 176 (1955)

STAHL, R., HORSTMANN u. HILSNITZ: Untersuchungen mittels der vitalen Jodfixation am strömenden Blute und am Knochenmark.
Virch. Arch. path. Anat. 257, 392 - 414 (1925)

STEFANINI, M. and W. DAMSHEK: Collection, preservation and transfusion of platelets.
N. England J. Med. 248, 797 - 802 (1953)

-- and S. KISTNER: Transfusion of platelets, platelet derivates and platelet substitutes in the management of thrombocytopenic states.
Proc. VI. Congr. Int. Soc. Blood Transfusion
Boston 1956, 378 - 381

STORTI, E. e. R. STORTI: La reazione di Feulgen in ematologia: Piastrine.
Monit. zool. ital. 46, 71 - 76 (1935)

-- e M. ZUBIANI: Ricerche di istochimica ematologica. Il glicogeno nelle cellule ematiche normale.
Boll. Soc. med. chir., Pavia 63, 127 - 131 (1949)

-- , S. PERUGINI and M. SOLDATI: Cytochemical investigations of normal megacaryocytes and platelets.
Acta haemat., Basel 10, 144 - 149 (1953)

TINACCI, F. e C. CESSI: Alcune osservazioni sulla conglutinatione piastrinica dopo azione della jaluronidasa sulla struttura chimica delle piastrine.
Boll. Soc. ital. biol. sper. 28, 283 - 286 (1952)

TORELLI, U. and C. MAURI: The content of free or easily extractable aminoacids and electrolytes in human platelets in normal and pathological conditions.
Proc. Int. Congr. Int. Soc. Haemat. Rom 1958. Bd. II, 854 - 857

TROUP, S.B., C.F. REED, G. v. MARINETTI and S.N. SWISHER: Thromboplastic factors in platelets and red blood cells: observations on their chemical nature and function in vitro coagulation.
J. Clin. Invest. 39, 342 - 351 (1960)

VOIT, K. u. H. KEMPA: Über den Nachweis von echter Kernsubstanz in den Thrombocyten.
Zschr. Biol., München 95, 635 - 638 (1934)

VOSS, D. u. A. HELLEM: Vergleichende Untersuchung zweier Thrombocytenfunktionen: Reaktion und Adhaesivität.
Verh. Dtsch. Ges. Inn. Med. 65, 195 - 196 (1959)

VULPIS , N.: Experimental study on thrombocytopenic purpura induced by immune anti-platelet serum.
Acta haemat., Basel 14, 72 - 82 (1955)

WACHSTEIN, M.: The distribution of histochemically demonstrable glycogen in human blood and bone marrow cells.
Blood 4, 54 - 59 (1949)

WAGNER, R.: The estimation of glycogen in whole blood and white cells.
Arch. Biochem. 11, 249 - 258 (1946)

WALLACH, D.F.H., D.M. SURGENOR and B.B. STEELE: Calcium-lipid complex in human platelets.
Blood 13, 589 - 598 (1958)

WALLER, H.D., G.W. LÖHR, O. KARGES u. R. GROSS: Fermenteigenschaften und Energiestoffwechsel der Thrombocyten.
VII. Kongr. Int. Ges. Haematol. Rom 1958, Bd. II, 796 - 800

WEBER, E., W. LITTMANN u. R. FREITAG: Über Beziehungen zwischen Glykogengehalt und Retraktionsvermögen von Blutplättchen.
Biochem. Biopharm. 12, 145 - 156 (1963)

WISLOCKI, G.B., J.J. RHEINGOLD and E.W. DEMPSEY: The occurance of the Perjodic-Acid-Schiff reaction in various normal cells of blood and connective tissue.
Blood 4, 562 - 568 (1949)

WOODSIDE, E.E. and W. KOCHOLATY (a): Carbohydrates of human and bovine platelets.
Blood 16, 1173 - 1183 (1960)

-- (b) Lipids of human and bovine platelets.
US Army Med. Res. Laborat. Rep. 425, 1 - 15 (1960)

-- , D.G. THERRIAULT and W. KOCHOLATY: Lipids of human platelets and their action on the blood coagulation process.
Blood 24, 76 - 91 (1964)

ZINGONI, U.: (a) Sulla presenza di glicogeno nei megacariociti e nelle piastrine del sangue.
Arch. fisiol., Firenze 51, 216 - 228 (1951)

-- (b) Glicogeno e acido ribonucleinico nei megacariociti e nelle piastrine del sangue? Ricerche istochimiche.
Boll. Soc. ital. biol. sper. 27, 1020 - 1022 (1951)

LEBENSLAUF

Als Tochter des Majors Konrad Joachim Merdas wurde ich, Ingrid Wieland, geb. Merdas, am 10. 12. 1939 in Idar-Oberstein geboren. Die Schulausbildung erfolgte auf der Volksschule in Niederrodenbach, Krs. Hanau/Main, dem Realgymnasium für Mädchen in Hanau/Main und der Edertal-Schule in Frankenberg/Eder, wo ich 1959 das Abitur ablegte.

Vom Wintersemester 1959 an studierte ich Medizin. Fünf Semester verbrachte ich in Gießen/Lahn, je eines in Würzburg und Berlin. Zum achten Semester kam ich nach Marburg/Lahn, wo ich am Pathologischen Institut die Doktorarbeit begann. Im September 1965 schloß ich mein medizinisches Studium mit dem Staatsexamen ab.

Während meiner Medizinalassistentenzeit war ich im Pathologischen Institut der Philipps-Universität Marburg/L., in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Neustadt a. Rbge., an der Medizinischen Poliklinik der Philipps-Universität Marburg/L. sowie in der gynäkologisch-geburtshilflichen Abteilung der Klinik St. Elisabeth Marburg/L. tätig.

Meine akademischen Lehrer waren in Gießen die Herren Professoren Ankel, Blasius, v. Denffer, Hanle, Kröhnke, Rollhäuser, Scharmann, Schuchardt, Staudinger und Thauer;
in Würzburg die Herren Professoren Altmann, Dubrauszky, Kley, Schröder, Wachsmuth und Wollheim;
in Berlin die Herren Professoren Franke, Gansau, Freiherr v. Kreß, Kujath, Lax, Loeschke, Oeser, Schmidt und Vogelsang;
in Marburg die Herren Professoren Berendes, Braun-Falco, Eicke, Exner, Gedigk, Hamm, Hartmann, Heuser, Hildebrandt, Hornung, Jacob, Linneweh, Sauer, Schleyer, Schmid, Schölmerich, Schrappe, Schwaiger, Siegert, Siess, Spiegelberg, Straub, Streicher und Würterle.

Herrn Prof. Dr. med. P. Gedigk danke ich für die Überlassung des Themas und für die Arbeitsmöglichkeit im Pathologischen Institut der Philipps-Universität Marburg.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Dr. med. H. Bechtelsheimer für seine Beratung und Hilfe bei der Durchführung der Experimente.